

基于P53/P21和碱基切除修复通路的五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸DNA损伤的保护作用研究

马娜¹, 赵海霞¹, 陈茜¹, 杨思琪¹, 尤旭¹, 马琼艳¹, 袁丁², 张长城^{1*}

1. 三峡大学医学院, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443002

摘要: 目的 基于P53/P21和碱基切除修复(BER)通路研究五子衍宗方对自然衰老大鼠睾丸DNA损伤的保护作用。方法 将16月龄SPF级SD雄性大鼠随机分为3组, 衰老模型组、五子衍宗方低剂量组(1 g/kg)和高剂量组(4 g/kg), 另取2月龄SD雄性大鼠作为青年对照组, 每组8只。给予普通饲料或含药饲料饲养4个月后, 处死大鼠, 取出睾丸组织。免疫荧光检测大鼠睾丸组织中DNA损伤相关蛋白 γ -H2AX及BER相关蛋白脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶(APE1)、8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(OGG1)和X线修复交错互补基因1(XRCC1)的表达和定位; ELISA法检测大鼠睾丸组织中8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的量; Western blotting法检测大鼠睾丸组织中p-P53和P21蛋白的表达水平。结果 与衰老模型组相比, 五子衍宗方能明显降低睾丸DNA损伤相关蛋白 γ -H2AX和BER相关蛋白OGG1、APE1和XRCC1的表达水平; ELISA检测结果显示, 与衰老模型组相比, 五子衍宗方能显著下调8-OHdG的量; Western blotting结果显示, 五子衍宗方能显著降低自然衰老大鼠睾丸p-P53、P21的蛋白表达水平。结论 五子衍宗方可通过调节P53/P21和BER通路减轻自然衰老大鼠睾丸DNA损伤。

关键词: 五子衍宗方; P53/P21; 碱基切除修复; 自然衰老; 睾丸; DNA损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1379-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.022

Protective effect of Wuzi Yanzong Prescription on testicular DNA damage in natural ageing rats based on P53/P21 and BER signal pathway

MA Na¹, ZHAO Hai-xia¹, CHEN Qian¹, YANG Si-qi¹, YOU Xu¹, MA Qiong-yan¹, YUAN Ding², ZHANG Chang-cheng¹

1. Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

2. Ren-He Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443002, China

Abstract: Objective To study the protective effect of Wuzi Yanzong Prescription (WYP) on DNA damage in testis of natural ageing rats based on P53/P21 signaling pathway and base excision repair (BER). **Methods** SPF grade 16-month-old male SD rats were randomly divided into three groups with eight rats in each group: ageing model group, low and high dose of WYP groups (1 and 4 g/kg). In addition, 2-month-old SD male rats were used as adult control group. The ageing model group and the adult control group were fed with normal diet for four months. Rats in the WYP groups were given the medicated feed for four months. After fasting for 12 h, the rats were sacrificed. Then, the testes were immediately removed from rats. The expression and localization of DNA damage-related protein γ H2AX and BER-related proteins OGG1, APE1, and XRCC1 were detected by immunofluorescence, and the content of 8-OHdG in testis was detected by ELISA. Also, the protein expression levels of p-P53 and P21 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the ageing model group, immunofluorescence results showed WYP significantly decreased the expression levels of DNA damage-related protein γ H2AX and BER-related proteins OGG1, APE1, and XRCC1 in testis of natural ageing rats. ELISA results showed that WYP significantly downregulated 8-OHdG levels, compared with the ageing model group. Moreover, Western blotting results showed that WYP significantly decreased the protein expression levels of p-P53 and P21 of the testis when compared with the ageing model group. **Conclusion** WYP reduced the DNA damage of testes in ageing related rats via P53/P21 and BER pathways.

Key words: Wuzi Yanzong Prescription; P53/P21; base excision repair; ageing; testis; DNA damage

收稿日期: 2018-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573931, 81373881, 81774316, 81503334)

作者简介: 马娜, 在读硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 13237132695 E-mail: mn1355310846@163.com

*通信作者 张长城, 博士, 教授, 研究方向为中药药理学。E-mail: greatwall@ctgu.edu.cn

随着生活水平和医疗卫生条件的明显改善, 人的平均寿命不断延长, 我国已进入了老龄化社会, 成为世界上老龄人口最多的国家^[1]。由于多种个人或社会的原因, 以及国家计划生育新政策的实施, 使得中老年男性有生育需求者日益增多。随着年龄的增加, 睾丸 DNA 损伤显著增加并伴随着基因组的稳定性下降。多项研究表明, 在老年男性精子中, DNA 双链损伤与单链损伤均明显增加, 且精子染色体的完整性下降^[2]; 在衰老小鼠与大鼠睾丸中, 精子细胞 DNA 损伤亦显著增加^[3-4]。DNA 作为遗传物质, 其完整性对生命个体准确无误地将遗传信息传递给下一代起到至关重要的作用。DNA 损伤及其修复一直是生命科学中的重大课题, 目前对各种因素引起的 DNA 损伤模式及其相应的修复机制都有了一定的研究, 但是对于自然衰老所致的睾丸 DNA 损伤及其碱基切除修复 (BER) 机制仍知之甚少。因此, 研究自然衰老所致的睾丸 DNA 损伤及 BER 机制具有极其重要的理论意义和应用价值。

五子衍宗方 (WYP) 是临床治疗男性生精功能障碍和不育的经典方剂, 由枸杞子、五味子、菟丝子、覆盆子、车前子组成, 有古今“种子第一方”之称, 具有促进睾丸生精功能与延缓衰老的药理作用。WYP 可减少老年男性肾虚者外周血白细胞 DNA 缺失^[5], 保护老龄大鼠骨骼肌 DNA 氧化损伤^[6]。临床研究也发现 WYP 可减少老年大鼠心脑线粒体 DNA 缺失^[7]。本课题组前期研究显示, WYP 对环磷酰胺所致的小鼠骨髓和肝脏细胞 DNA 损伤有保护作用^[8-9]。但是 WYP 是否对自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤具有保护作用目前尚不明确。因此, 本实验以自然衰老大鼠为模型, 基于 P53/P21 和 BER 通路研究 WYP 对自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤的保护作用, 并对其机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 仪器

LEICA TP 1020 全自动脱水机, 德国 Leica 公司; LEICA EG1150C 超薄切片机, 奥地利莱卡公司; PowerPac200 Western blotting 电泳仪和电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司; CT15RT 高速冷冻离心机, 上海天美生化仪器设备工程有限公司; Bioshine ChemiQ4800 mini 化学发光凝胶成像显影设备, 上海欧翔科学仪器有限公司; 激光共聚焦显微镜, 日本 Nikon 公司。

1.2 试剂

β -actin 抗体, Cell Signaling 公司; γ -H2AX、

P21、X 线修复互补基因 1 (XRCC1) 抗体, Abcam 公司; p-P53 抗体, Santa Cruz 公司; AP 核酸内切酶-1 (APE1)、8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶 1 (OGG1) 抗体, Novus 公司; 羊抗鼠、羊抗兔、兔抗羊二抗, 武汉科瑞有限公司; Alexa Fluor 488 驴抗兔 IgG (H+L) 抗体, Jackson Immuno Research 公司; 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 试剂盒, Cayman Chemical 公司; BeyoECL Plus 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 碧云天生物技术有限公司。

1.3 实验动物

SPF 级 16 月龄 SD 雄性大鼠 24 只, 体质量 (650 $\pm$ 50) g; 2 月龄 SD 雄性大鼠 8 只, 体质量 (180 $\pm$ 30) g, 均购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2012-0001, 批号 11400700003309; 大鼠分笼饲养于 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、湿度 (55 $\pm$ 5) %、12 h 光暗交替的 SPF 级实验动物中心, 自由饮水和进食。

1.4 药材

WYP 由车前子 (68 g, 批号 15063002)、覆盆子 (135 g, 批号 15071702)、五味子 (35 g, 批号 15080702)、枸杞 (275 g, 批号 15083001)、菟丝子 (275 g, 批号 15061901) 粉碎成细粉, 充分混和而成, 上述 5 味药材均购自宜昌市中医医院。药材经三峡大学汪均植教授鉴定均为正品。车前子为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥成熟种子; 覆盆子为蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实; 五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实; 菟丝子为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子; 枸杞为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实。

2 方法

2.1 WYP 的制备

根据《中国药典》2015 年版一部^[10]“五子衍宗丸”项下配方称取各药材充分混合粉碎制备而成。

2.2 动物分组及给药

16 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠 24 只, 随机分为衰老模型组、WYP 低剂量组 (1 g/kg) 和 WYP 高剂量组 (4 g/kg), 每组 8 只。2 月龄雄性 SD 大鼠 8 只作为青年对照组。其中衰老模型组和青年对照组给予普通饲料喂养, WYP 各剂量组给予相应的含药饲料 (根据每只大鼠每天的进食量计算药物和饲料的比例, 将其混合制成含药饲料。实时监测大鼠的

进食情况来确保剂量)。喂养 4 个月, 实验前 12 h 禁食不禁水。

2.3 大鼠睾丸组织 8-OHdG 量的测定

处死大鼠, 取出睾丸组织约 70 mg, 加入一定量的 PBS 缓冲液, 缓冲液中加入蛋白酶抑制剂。匀浆器将标本匀浆充分, 4 °C、3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液备用。严格按试剂盒说明书操作, 测定 8-OHdG 的量。

2.4 免疫荧光检测大鼠睾丸组织 γ -H2AX、OGG1、APE1 和 XRCC1 蛋白表达

取大鼠睾丸组织切片放于 60 °C 烘箱烤片约 4 h, 二甲苯与梯度乙醇常规脱蜡, 用柠檬酸修复液高压修复抗原, 5% BSA 封闭 1 h 后, 加入一抗 (1:500) 于 4 °C 冰箱孵育过夜, 二抗 (1:500) 在常温孵育 1 h, 经 DAPI 染色、抗荧光淬灭剂封片后在激光共聚焦显微镜下随机观察 5 个视野, 拍照取图。

2.5 Western blotting 检测大鼠睾丸组织 p-P53 和 P21 蛋白表达

取 70 mg 大鼠睾丸组织于 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL PBS 于冰上快速剪碎, 离心弃上清, 重复操作 3 次后, 加入适量蛋白裂解液-苯甲基磺酰氟 (PMSF)-蛋白磷酸酶抑制剂 (100:1:1), 匀浆器匀浆后, 离心取上清, 加入上样缓冲液, 蛋白经煮沸灭活后, 进行凝胶电泳并恒流转膜, 脱脂牛奶封闭约 1 h, 孵育一抗 (1:1 000) 放于 4 °C 冰箱过夜, 室温孵育二抗 (1:3 000) 1 h, ECL 化学发光显影。

2.6 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 统计学软件分析数据, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。同组比较采用连续观察资料的方差分析, 组间比较采用单因素方差分析。

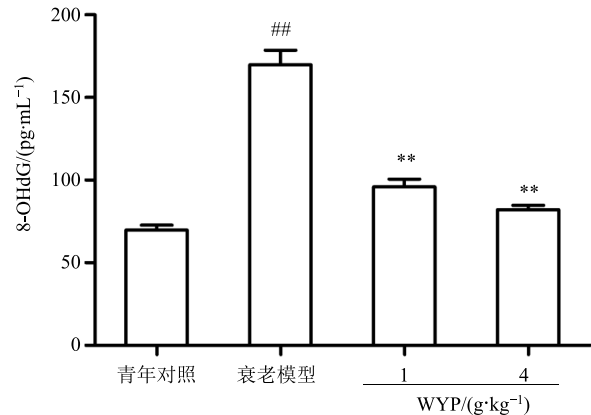
3 结果

3.1 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织中 8-OHdG 量的影响

实验结果 (图 1) 显示, 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 8-OHdG 水平显著上升 ($P < 0.01$)。与衰老模型组比较, WYP 高、低剂量组大鼠睾丸组织中 8-OHdG 水平均显著下降 ($P < 0.01$)。

3.2 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX、OGG1、APE1 和 XRCC1 蛋白表达的影响

免疫荧光结果 (图 2) 显示, 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 DNA 损伤标志蛋白 γ -H2AX 表达水平显著升高 ($P < 0.01$), BER 相关蛋白 OGG1、APE1、XRCC1 表达水平显著升高



与青年对照组比较: ## $P < 0.01$; 与衰老模型组比较: ** $P < 0.01$, 下同

$P < 0.01$ vs adult control group; ** $P < 0.01$ vs ageing model group, same as below

图 1 WYP 对自然衰老大鼠睾丸中 8-OHdG 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of WYP on level of 8-OHdG in testis of natural ageing rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

($P < 0.01$)。给予 WYP 干预后, 大鼠睾丸组织中 γ -H2AX、OGG1、APE1 和 XRCC1 蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.01$)。

3.3 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织中 p-P53 和 P21 蛋白表达的影响

结果显示 (图 3), 与青年对照组比较, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 p-P53 和 P21 蛋白表达水平均显著上升 ($P < 0.01$)。与衰老模型组相比, WYP 低、高剂量组大鼠 p-P53 和 P21 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

DNA 作为生命活动中至关重要的遗传物质, 随着衰老的发生, 其不可避免的发生不同程度的损伤。8-OHdG 是最常见的一种 DNA 氧化产物, 现已被广泛用作 DNA 氧化损伤的标志物, 其含量变化可直接反映细胞 DNA 受氧化损伤的程度^[11]。当 DNA 碱基受氧自由基攻击时, 其脱氧核糖上的 C8 位鸟嘌呤经脱氢作用氧化生成 8-OHdG 引起 DNA 损伤。H2AX 组蛋白家族成员 γ -H2AX 可应答于各种因素诱导的 DNA 损伤磷酸化位点, 并迅速聚集于细胞核损伤部位, 且其磷酸化水平可反映损伤程度, 因此常被作为 DNA 损伤标志物^[12]。本研究结果表明, 与青年对照组相比, 衰老模型组大鼠睾丸组织中 DNA 损伤标志物 8-OHdG 和 γ -H2AX 表达量均显著升高。与衰老模型组相比, WYP 低、高剂量组大鼠睾丸组织中 8-OHdG 和 γ -H2AX 表达均显

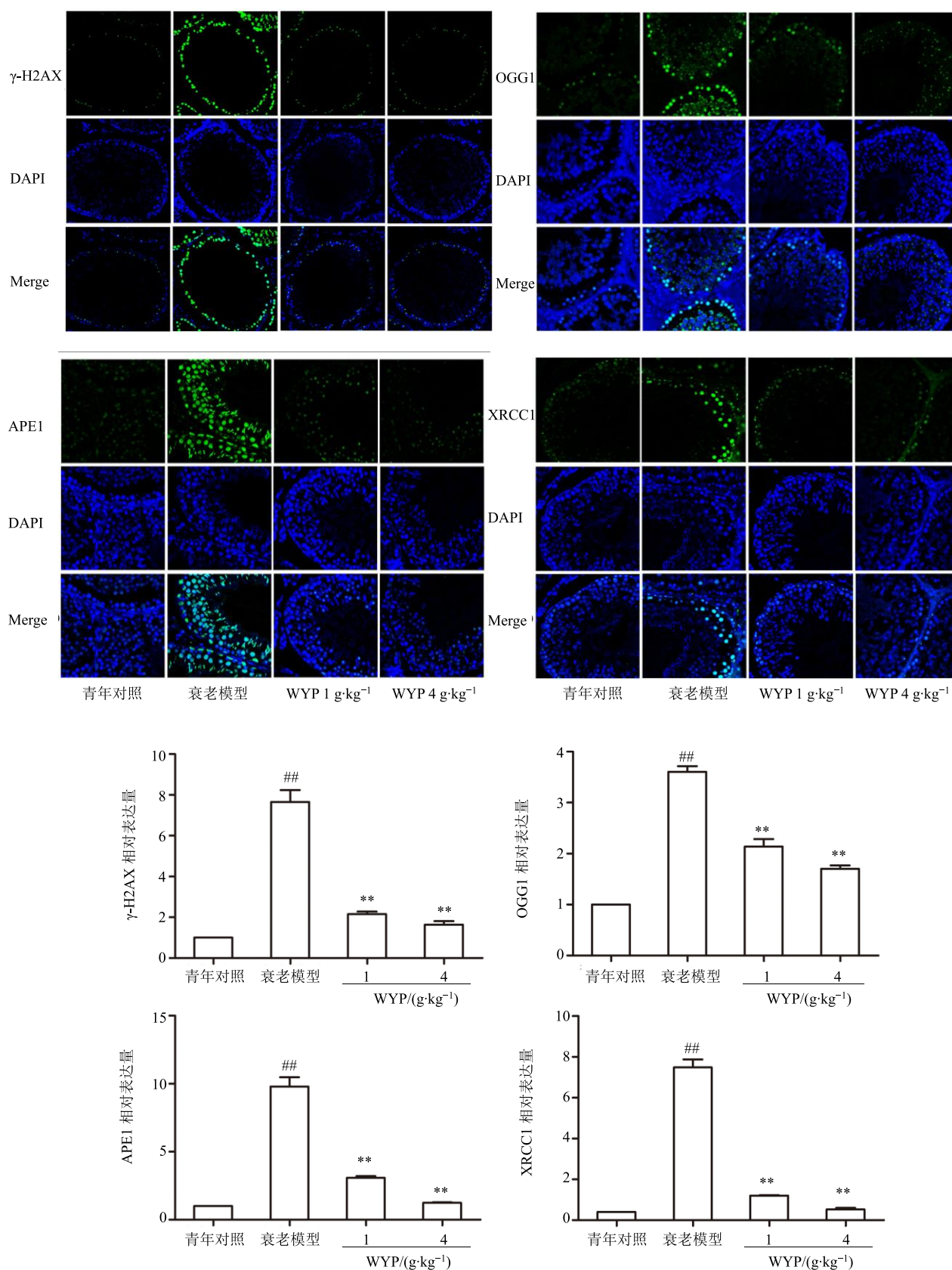


图 2 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织 γ -H2AX、OGG1、APE1 和 XRCC1 蛋白表达的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of WYP on protein expression of γ -H2AX, OGG1, APE1, and XRCC1 in testis tissues of natural ageing rats ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

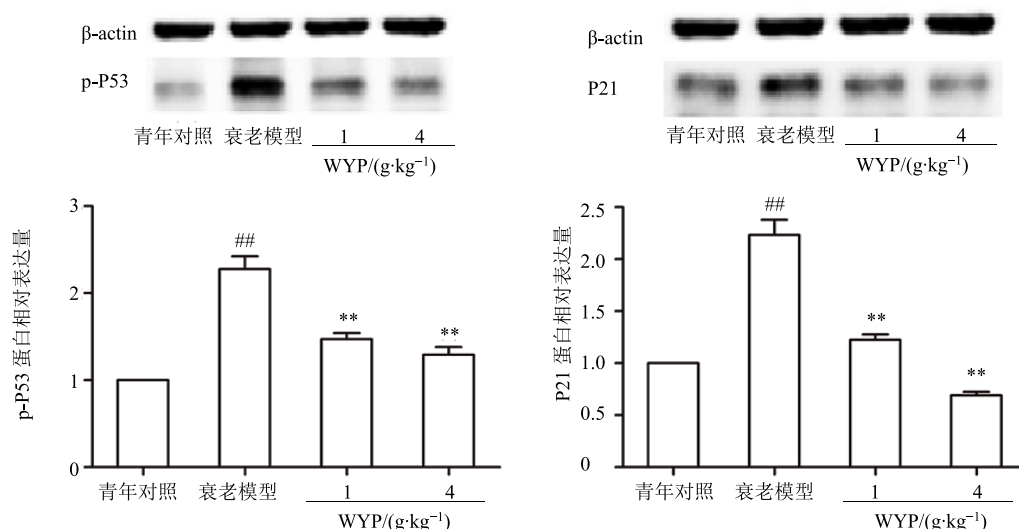


图 3 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织中 p-P53 和 P21 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of WYP on p-P53 and P21 protein expression in testis of natural ageing rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

著降低,提示 WYP 对自然衰老大鼠睾丸组织 DNA 损伤有一定保护作用。

DNA 损伤反应是一个高度保守的信号感应过程,该过程必须快速频繁的运行来修复 DNA 结构上的损伤。DNA 损伤反应信号通路被看作是机体的一道屏障。在进化过程中,生物个体获得了应对 DNA 损伤的一系列修复功能,确保遗传信息得以准确地传递。P53 是哺乳动物细胞 DNA 损伤修复反应途径中最主要的转录因子^[13]。据文献报道^[14-16],P53 可与 γ -H2AX 共同作用于 DNA 损伤修复等多个过程。P21 是细胞周期素依赖性激酶抑制因子,是 P53 肿瘤抑制作用中的主要决定因子,位于 P53 基因下游,活化的 P53 转录激活 P21 共同构成细胞周期 G₁ 检查站;当 DNA 损伤时,P53 发生磷酸化而被激活,并有基因表达增加,反式激活其下游基因 P21 的表达,引起细胞周期 G₁ 期阻遏,为 DNA 损伤修复赢取时间^[17-18]。Western blotting 结果显示,与青年对照组比较,自然衰老组大鼠睾丸 DNA 损伤修复相关蛋白 p-P53、P21 表达水平显著升高,而 WYP 低、高剂量均能显著降低其表达水平。以上结果表明 WYP 可通过 P53/P21 信号通路来调控自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤修复。

BER 是人类细胞多种 DNA 修复机制中最重要的修复途径之一,由 OGG1、APE1、XRCC1 等蛋白参与,在维持 DNA 完整性中起着至关重要的作用^[19-21]。有研究发现 BER 与衰老及年龄相关的神经

退行性疾病密切相关^[22]。BER 的启动需要多种糖基化酶,首先是 DNA 修复酶 OGG1 启动高度保守的碱基切除修复通路识别并切除受损碱基,产生 1 个脱嘌呤/脱嘧啶位点(AP 位点)。APE1 作为 BER 途径的第 2 步反应限速酶,通过 Mg²⁺ 依赖的核酸内切酶活性,在 AP 位点处切割产生单链断裂,形成 3'-OH 端和 5'-脱氧核糖磷酸末端,继而由 DNA 聚合酶 β (Pol β) 通过其磷酸二酯酶活性水解除去 5'-脱氧核糖磷酸残基,并通过碱基互补配对,插入 1 个正确的碱基。XRCC1 在 BER 中起着支架蛋白的作用,可以与多个 DNA 修复相关蛋白交互作用并招募到 DNA 损伤部位,最终完成 DNA 的修复。本研究结果表明,与青年对照组比较,自然衰老组大鼠睾丸组织中 OGG1、APE1 和 XRCC1 的表达水平显著升高,而 WYP 低、高剂量组大鼠睾丸组织中 OGG1、APE1 和 XRCC1 的表达水平均显著下降。可能是随着大鼠睾丸组织的自然衰老,机体启动 DNA 自我修复功能,使其相关修复蛋白高表达,而给予 WYP 后,其对衰老机体 DNA 损伤有保护作用,自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤减少使其 BER 反应减弱,从而使其相关蛋白表达下调。

综上所述,WYP 能减轻自然衰老大鼠睾丸 DNA 损伤,其作用机制可能与调控 P53/P21 和 BER 信号通路有关。这为 WYP 改善衰老相关的睾丸生精功能衰退提供了一定的实验基础,同时也为临床应用 WYP 提供了可靠的实验依据。但 WYP 对 DNA

损伤修复的详细分子机制还有待进一步研究, 后续本课题组将对其改善睾丸 DNA 损伤的分子机制进行更深入的探讨。

参考文献

- [1] 孟晓芹, 刘新萍. 我国人口老龄问题与对策 [J]. 医学信息旬刊, 2011, 24(1): 358-358.
- [2] Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, *et al.* The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population [J]. *J Assist Reprod Gen*, 2011, 28(5): 425-432.
- [3] Nie B, Gan W, Shi F, *et al.* Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, doi: 10.1155/2013/303181.
- [4] Smith T B, De Iuliis G N, Lord T, *et al.* The senescence-accelerated mouse prone 8 as a model for oxidative stress and impaired DNA repair in the male germ line [J]. *Reprod*, 2013, 146(3): 253-262.
- [5] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体活力的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 101-103.
- [6] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠骨骼肌线粒体 DNA 氧化损伤的影响 [J]. 中国老年学, 2001, 21(4): 292-294.
- [7] 王学美, 富 宏, 刘庚信. 五子衍宗丸及其拆方对老年大鼠心脏线粒体 DNA 缺失、线粒体呼吸链酶复合体及 ATP 合成的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(6): 437-440.
- [8] 刘苗苗, 袁 丁, 黄威峰, 等. 五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠 DNA 损伤的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 38-40.
- [9] 黄威峰, 刘苗苗, 袁 丁, 等. 五子衍宗方对环磷酰胺致小鼠肝脏细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2015, 37(5): 1093-1096.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] Çanakçı C F, Çanakçı V, Tatar A, *et al.* Increased salivary level of 8-hydroxydeoxyguanosine is a marker of premature oxidative mitochondrial DNA damage in gingival tissue of patients with periodontitis [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2009, 57(3): 205-211.
- [12] An J, Huang Y C, Xu Q Z, *et al.* DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression [J]. *BMC Mol Biol*, 2010, doi: 10.1186/1471-2199-11-18.
- [13] Talukder K A, Azmi I J, Ahmed K A, *et al.* Activation of p53/ATM-dependent DNA damage signaling pathway by shiga toxin in mammalian cells [J]. *Microb Pathogen*, 2012, 52(6): 311-317.
- [14] Brady C A, Jiang D, Mello S S, *et al.* Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA damage responses and tumor suppression [J]. *Cell*, 2011, 145(4): 571-583.
- [15] Hu J, Wang Y. p53 and the PWWP domain containing effector proteins in chromatin damage repair [J]. *Cell Dev Biol*, 2013, doi: 10.4172/2168-9296.1000112.
- [16] Wang A, Ning Z, Lu C, *et al.* USP22 induces cisplatin resistance in lung adenocarcinoma by regulating γ H2AX-mediated DNA damage repair and Ku70/Bax-mediated apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00274.
- [17] Mazzatti D J, Lee Y J, Helt C E, *et al.* p53 modulates radiation sensitivity independent of p21 transcriptional activation [J]. *Am J Clin Oncol*, 2005, 28(1): 43-50.
- [18] Dolan D W, Zupanec A, Nelson G, *et al.* Integrated stochastic model of DNA damage repair by non-homologous end joining and p53/p21-mediated early senescence signalling [J]. *PLoS Comp Biol*, 2015, 11(5): e1004246.
- [19] Hoeijmakers J H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 366-374.
- [20] Petermann E, Keil C, Oei S L. Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER [J]. *DNA Repair*, 2006, 5(5): 544-555.
- [21] Krokan H E, Nilsen H, Skorpen F, *et al.* Base excision repair of DNA in mammalian cells [J]. *Febs Lett*, 2000, 476(1/2): 73-77.
- [22] Leandro G S, Sykora P, Bohr V A. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases [J]. *Mutat Res*, 2015, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.12.011.